(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 457 665**

(21) Número de solicitud: 201200967

(51) Int. CI.:

C12N 9/10 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN B1

(22) Fecha de presentación:

28.09.2012

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

28.04.2014

Fecha de la concesión:

05.11.2014

(45) Fecha de publicación de la concesión:

13.11.2014

(73) Titular/es:

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA (100.0%)
Pabellón de Gobierno, Avda. de los Castros s/n
39005 Santander (Cantabria) ES

(72) Inventor/es:

MONCALIÁN MONTES, Gabriel;
DE LA CRUZ CALAHORRA, Fernando;
VILLA TORRECILLA, Juan Antonio ;
LÁZARO PINTO , Beatriz y
CABEZAS ISIDRO, Matilde Andrea

(54) Título: **Triacilglicerol sintasas termoestables y usos de las mismas**

(57) Resumen:

Polinucleótido aislado que presenta al menos un 75% de homología con la secuencia SEQ ID NO 1. Polipéptido codificado por el polinucleótido anterior, que presenta actividad triacilglicerol sintasa. Vector que comprende el polinucleótido anterior. Célula hospedadora transformada con dicho vector. Método para la obtención de TAGs basado en la expresión del polipéptido codificado por el polinucleótido anterior mediante el cultivo de la célula hospedadora transformada anterior en un medio que comprende residuos o desechos industriales como fuente de carbono. Empleo de los TAGs obtenidos en dicho método como biocombustible o como material de partida para la obtención de biocombustible.

ES 2 457 665 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

TRIACILGLICEROL SINTASAS TERMOESTABLES Y USOS DE LAS MISMAS

Campo de la invención

La presente invención se refiere de forma general a polinucleótidos recientemente identificados, aislados y optimizados, a las proteínas codificadas por dichos polinucleótidos, así como a los métodos para la producción de dichas proteínas y a los usos de dichos polinucleótidos y proteínas. De forma particular, la presente invención contempla un polinucleótido aislado del microorganismo *Thermomonospora curvata*, que codifica para una enzima triacilglicerol sintasa termoestable, el método para la expresión de dicha enzima y el empleo de la misma para la obtención de triglicéridos a partir de diferentes substratos.

Antecedentes de la invención

Hoy en día, salvo cierta producción a partir de aceites unicelulares, el aceite rico en ácidos grasos Omega-3 se obtiene principalmente de aceite de pescado produciéndose a nivel mundial alrededor de 1 millón de toneladas al año. De esta producción, aproximadamente un 80% se dedica a la acuicultura. Un análisis reciente del mercado europeo para los aceites Omega-3 estimaba que el mercado estaba todavía en su etapa del crecimiento con un valor actual de unos 300 millones de USD y un volumen estimado de 15.000 toneladas. El precio medio es de 15 USD/kg, con precios que fluctuan entre 2 USD/kg y 300 USD/kg. Hay por lo menos 50 proveedores de aceite de pescado, pero los diez principales mueven más del 70 por ciento del mercado.

Así todo, la gran demanda mundial de aceite se debe a su uso como materia prima para la obtención de biodiesel, la principal alternativa renovable al diesel de petróleo. Anualmente se consumen a nivel mundial más de 7,000 millones de litros de biodiesel. Este biodiesel está compuesto de esteres metílicos y etílicos de ácidos grasos (FAMEs y FAEEs, respectivamente) producidos por la transesterificación química de triglicéridos animales y vegetales *(Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S., and Tiffany, D. (2006). Environmental,*

economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 11206–11210). De hecho, su producción utiliza principalmente como materia prima aceites vegetales comestibles (palma, soja, o colza). Así, la explotación de estas materias compite con el suministro de alimentos en el mundo siendo por tanto, un proceso problemático tanto económica como éticamente *(Rude, M.A., and Schirmer, A. (2009). New microbial fuels: a biotech perspective. Curr. Opin. Microbiol. 12, 274–281).*

Debido a la baja productividad de las cosechas de semillas oleaginosas, el abastecimiento de la demanda actual de biodiesel no puede lograrse sin un aumento de las áreas del cultivo. La conversión de hábitats naturales en monocultivos (como las plantaciones de palma en la selva tropical) disminuyen la biodiversidad y reducen la capacidad natural de captar CO_2 *(Fortman, J.L., Chhabra, S., Mukhopadhyay, A., Chou, H., Lee, T.S., Steen, E., and Keasling, J.D. (2008). Biofuel alternatives to ethanol: pumping the microbial well. Trends Biotechnol. 26, 375–381).*

Por todo ello, a pesar de que el biodiesel tiene evidentes beneficios socioeconómicos como la seguridad en el equilibrio, la reducción de emisiones netas de CO_2 o el desarrollo de áreas rurales, actualmente el biodiesel llamado de primera generación no cumple muchas de estas premisas. Por ello hace falta el desarrollo de los llamados biocarburantes de segunda generación cuya principal característica es que en su producción no compiten con cultivos vegetales para consumo humano. La producción de triglicéridos por microorganismos oleogénicos (cuyo mayor exponente hasta la fecha son las bacterias rhodococcus) para su transformación a biodiesel entraría por tanto en esta categoría de biodiesel de segunda generación.

Una solución a la obtención de aceite o triglicéridos (TAGs) genéricos para la producción de biodiesel o enriquecidos en ácidos grasos omega-3 para su uso en acuicultura es su producción en organismos unicelulares (SCO de las siglas en ingles single cell oils o aceite unicelular). Se ha logrado con éxito la producción de aceites ricos en ácidos grasos omega-3 DHA en algas unicelulares y su comercialización como aditivo para leches infantiles por parte de la empresa americana Martek. Sin embargo estas algas son difíciles de modificar genéticamente para producir otros aceites y crecen relativamente lento con sustratos

específicos. Por ello hace tiempo que se intenta producir aceites unicelulares en bacterias. En el caso de la bacteria oleogénica mas estudiada (*Rhodococcus opacus)*, tiene un tiempo de generación algo más corto que las algas unicelulares (2 horas), pero es difícil de modificar y solo produce el acúmulo de aceíte en medios de cultivo específicos. Por todo ello se ha intentado en el último lustro producir aceite en *Escherichia Coli.*

Escherichia coli es el organismo procariota mas estudiado en el laboratorio y con mayores posibilidades de transformación y modificación, con un tiempo de generación muy corto (unos 20 minutos) y un amplio rango de substratos que puede utilizar como medio de cultivo.

La aproximación para producir TAGs en E. coli ha sido la expresión de diversos genes que codifican para los enzimas WS/DGAT (sintasa de ceras/diacilglicerol aciltransferasa), responsables de la acumulación de lípidos neutros en diferentes microorganismos.

La expresión de los enzimas WS/DGAT de Acinetobacter sp *(Stöveken, T., Kalscheuer, R., Malkus, U., Reichelt, R., and Steinbüchel, A. (2005). The wax ester synthase/acyl coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase from Acinetobacter sp. strain ADP1: characterization of a novel type of acyltransferase. J. Bacteriol. 187, 1369–1376)*, Marinobacter aquaolei *(Holtzapple, E., and Schmidt-Dannert, C. (2007). Biosynthesis of isoprenoid wax ester in Marinobacter hydrocarbonoclasticus DSM 8798: identification and characterization of isoprenoid coenzyme A synthetase and wax ester synthases. J. Bacteriol. 189, 3804–3812)* o Alcanivorax borkumensis (*Kalscheuer, R., Stöveken, T., Malkus, U., Reichelt, R., Golyshin, P.N., Sabirova, J.S., Ferrer, M., Timmis, K.N., and Steinbüchel, A. (2007). Analysis of storage lipid accumulation in Alcanivorax borkumensis: Evidence for alternative triacylglycerol biosynthesis routes in bacteria. J. Bacteriol. 189, 918–928*) no ha mostrado una acumulación destacable de aceite en E. coli. De todos modos, la enzima WS/DGAT de *Acinetobacter calcoacéticus* aparece recogida en el documento WO 03/074676 A2, por su capacidad de producir ceras y la WS/DGAT de M. aquaolei en el documento (US2009/0117629 A1) por su capacidad de producir ceras isoprenoides. Además se ha descrito un método para producir esteres etílicos de ácidos grasos directamente en E. coli que podrían utilizarse como biodiesel. Sin embargo ni este método *(Kalscheuer, R., Stölting, T., and Steinbüchel, A. (2006).*

Microdiesel: Escherichia coli engineered for fuel production. Microbiology (Reading, Engl.) 152, 2529–2536) ni modificaciones del mismo *(Steen, E.J., Kang, Y., Bokinsky, G., Hu, Z., Schirmer, A., McClure, A., Del Cardayre, S.B., and Keasling, J.D. (2010). Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass. Nature 463, 559–562)* ha producido cantidades de biodiesel significativas utilizando el enzima WS/DGAT de Acinetobacter calcoaceticus. En ambos se observa una producción significativa de ceras (wax esters) pero no de triglicéridos (TAGs).

En vista de la escasa actividad de producción de TAGs en E coli observada con los enzimas WS/DGAT utilizados hasta la fecha, los autores de la presente invención, tras una importante labor de investigación, han empleado un enzima de la familia WS/DGAT identificada en un organismo termófilo como es *Thermomonospora curvata* (tDGAT) observando, de forma sorprendente, que la expresión de dicha enzima en E. coli da lugar a una gran producción de TAGs en comparación con el empleo de otras enzimas WS/DGAT de proteobacterias. De forma ventajosa, el método desarrollado en base a la expresión de esta enzima permite emplear diversos substratos para la obtención de aceite en E.coli en un corto espacio de tiempo.

Objeto de la invención

En primer lugar, es objeto de la invención un polinucleótido aislado que presenta al menos un 75% de homología con la secuencia SEQ ID NO 1, así como el polipéptido codificado por dicho polinucleótido, que presenta actividad triacilglicerol sintasa.

Es también objeto de la invención un vector que comprende el polinucleótido de la invención.

Asimismo, es objeto de la invención una célula hospedadora transformada con el vector de la invención.

Por otra parte, es también objeto de la invención un método para la obtención de TAGs basado en la expresión del polipéptido codificado por el polinucleótido de la invención

mediante el cultivo de la célula hospedadora transformada de la invención en un medio que comprende residuos o desechos industriales como fuente de carbono.

Asimismo, es objeto de la invención el empleo de la célula hospedadora de la invención para la obtención de TAGs.

Finalmente, es objeto de la invención el empleo de los TAGs obtenidos en el método de la invención como biocombustible o como material de partida para la obtención de biocombustible.

Descripción de las figuras

Figura 1. Análisis de los extractos orgánicos crudos obtenidos a partir de la cepa C41 de *E. coli*. Calle 1, control ácido oleico; 2, control trioleína; 3, pET 29c:mbDGAT1 (A1TX06) de M. aquaolei; 4 pET29c:mbDGAT2 (A1U572) de M. aquaolei; 5, pET29c:abDGAT1 (Q0VKV8) de A. borkumensis; 6 pET29c:tDGAT (YP_003301387) de T. curvata; 7, pET29c. La punta de flecha blanca señala la distancia de migración de los TAGs.

Figura 2. Relación entre la proteína tDGAT expresada y el acumulo de TAG **A**. Gel SDS-PAGE al 10% con lisados totales de las células recogidas tras los periodos de inducción indicados. La punta de flecha negra indica la posición de la proteína tDGAT **B**. Análisis de los extractos orgánicos crudos Calle 1, control ácido oleico; 2, control trioleína; 3, vector pET29c; 4, 5 y 6 pET29c:TDGAT (YP_003301387) de T. curvata inducido 3, 6 y 24 horas respectivamente. La punta de flecha blanca señala la distancia de migración de los TAGs.

Figura 3. Localización por microscopía de la fluorescencia producida por rojo Nilo en células de E. Coli C41 a distintas longitudes de onda, filtro rojo (543 nm), filtro verde (488 nm) y sumatorio de los dos. En panel izquierdo (A) células transformadas con pET29, imagen con los dos filtros por separado y el sumatorio y zoom al microorganismo. En panel derecho (B) células transformadas con pET29c: tDGAT, imágenes con los dos filtros por separado, el

sumatorio y zoom a un grupo de microorganismos. La punta de flecha blanca señala las inclusiones lipídicas.

Figura 4. Cromatografía de gases de los FAMEs obtenidos de la extracción de TAGs del cultivo de *E. Coli* cepa C41(DE3) transformada con (A) pET29c o (B) pET29c:tDGAT . En cada una de las gráficas aparecen una serie de picos con la especie molecular de ácido graso identificado en el caso de los mayoritarios.

Figura 5. Producción de TAG por C41(DE3) pET29c:tDGAT con diferentes sustratos. Análisis de los extractos orgánicos crudos crecidos en 50 ml de medio mínimo variando la fuente de carbono a una concentración de 40 g/l. Calle 1, control ácido oleico; 2, control trioleína; 3, Glucosa; 4, Gluconato ; 5, Fructosa; 6,Xilosa ; 7, Lactosa; 8, Glicerol ; 9, Control pET29c. La flecha blanca señala la distancia de migración de los TAGs.

Figura 6. Análisis por TLC de los extractos orgánicos crudos de la transformación con pBAD33:tDGAT de cepas de *E. coli* DH5α. Las células fueron cultivadas en LB con concentraciones variables de arabinosa y distintos tiempos de inducción. Calle 1, control ácido oleico; 2, control trioleína; 3, pBAD33:tDGAT 3 horas de inducción a 0 mM; 4, pBAD33:tDGAT 16 horas sin inducción; 5, pBAD33:tDGAT 3 horas de inducción a 0.5 mM; 6, pBAD33:tDGAT 16 horas de inducción a 0.5 mM; 7, pBAD33:tDGAT 3 horas de inducción a 1 mM; 8, pBAD33:tDGAT 3 horas de inducción a 1 mM; 9, C41 pBAD33 16 horas sin inducción. La flecha blanca señala la distancia de migración de los TAGs.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a la identificación, aislamiento y optimización de un gen que codifica para una enzima WS/DGAT en *Thermomonospora curvata* (tDGAT). La secuencia nucleotídica del gen ha sido optimizada para su expresión en gamma-proteobacterias, de forma más concreta en *Escherichia coli* y se muestra en la SEQ ID NO 1 (figura 1). Del mismo modo, se ha identificado la secuencia de aminoácidos de la enzima tDGAT codificada

por el gen y se muestra en la SEQ ID NO 2 (figura 2).

Aunque de forma particular se contempla la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO 1, cualquier experto en la materia entiende que cualquier otra forma equivalente funcional biológicamente de dicha secuencia nucleotídica puede ser aislada empleando técnicas convencionales de hibridación DNA-DNA y DNA-RNA. Así, la presente invención también contempla secuencias nucleotídicas que hibridan con la SEQ ID NO 1 y que codifican proteínas que exhiben la misma o similar actividad biológica que la proteína de SEQ ID NO 2. Del mismo modo, se contempla la secuencia nucleotídica original del gen, que presenta un 75% de homología con la SEQ ID NO 1 y que codifica para el mismo polipéptido.

Así, en un aspecto principal de la invención se contempla un polinucleótido aislado, que codifica para una enzima WS/DGAT, que presenta al menos un 75% de homología con la secuencia SEQ ID NO 1, preferiblemente al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 85%, aún más preferiblemente al menos un 90% y aún más preferiblemente al menos un 95% (polinucleótido de la invención).

Del mismo modo, en otra realización principal de la invención se contempla un polipéptido aislado, con actividad triacilglicerol sintasa, codificado por el polinucleótido de la invención, que presenta al menos un 75% de homología con la secuencia SEQ ID NO 2, preferiblemente al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 85%, aún más preferiblemente al menos un 90% y aún más preferiblemente al menos un 95% (polipéptido de la invención).

Los polinucleótidos de la presente invención pueden emplearse para producir proteínas (enzimas WS/DGAT) mediante el empleo de vectores recombinantes de expresión que contengan dichos polinucleótidos.

Así, en otra realización principal se contempla un vector que comprende el polinucleótido de la invención (vector de la invención). En la presente invención se pueden emplear una gran variedad de vectores existentes para la expresión de genes en bacterias, particularmente en

Escherichia coli, aunque de forma particular, dicho vector se selecciona de entre pET29c y pBAD33.

La secuencia nucleotídica se inserta en el vector por medio de técnicas convencionales, de uso rutinario en el estado de la técnica.

En otra realización principal de la invención se contempla una célula hospedadora transformada con el vector de la invención (célula hospedadora de la invención). De forma particular, la célula hospedadora es una bacteria. De forma preferida, dicha bacteria es una gamma-proteobacteria. Más preferiblemente, dicha gamma-proteobacteria es Escherichia coli.

Para la transformación de los plásmidos construidos se emplean técnicas habituales en el estado de la técnica. De forma particular se emplea la técnica de la electroporación.

En una realización particular se contempla una cepa de Escherichia coli transformada con el vector pET29 que comprende el polinucleótido de secuencia SEQ ID NO 1.

La presente invención también contempla métodos para la producción de triglicéridos a partir de la expresión del polipéptido de la invención, enzima con actividad WS/DGAT, a partir de células transformadas con la secuencia polinucleótidica de la invención.

Así, en otra realización principal se contempla un método para la obtención de TAGs que comprende los siguientes pasos:

a) Obtención de la célula hospedadora transformada de la invención,
b) Cultivo de la célula hospedadora transformada obtenida en a) en un medio de cultivo que comprende residuos o desechos industriales como fuente de carbono, para la expresión de la enzima con actividad WS/DGAT codificada por el polinucleótido de la invención, y
c) Recuperación de los TAGs acumulados en la célula hospedadora o en el medio de cultivo de b).

En el paso b) se emplean inductores para la expresión heteróloga del gen. La expresión del gen está silenciada hasta que se añade el inductor. Esto hace que las células se comporten como si no estuviesen transformadas hasta que se inducen. En este caso, las células crecen sin sobreexpresar el gen tDGAT hasta que se añade, de forma preferida, IPTG (o arabinosa). Esto también sirve para comprobar que el fenotipo observado (es decir, la producción de TAG), está directamente relacionado con la adición de inductor y, por tanto, a la expresión del gen de interés. En principio se podría utilizar un promotor constitutivo (que no responde a inductor y se expresa en todo momento), pero no se podría controlar la producción de TAGs a voluntad. También es posible utilizar lactosa en lugar de IPTG u otro tipo de promotores que respondan a otro tipo de inductores (por ejemplo inductores mas baratos que el IPTG como la glucosa o incluso la luz).

En una realización preferida, el método de la invención para la obtención de TAGs comprende los siguientes pasos:

a) Obtención de una cepa de Escherichia coli transformada con el vector pET29c que comprende el polinucleótido aislado de secuencia SEQ ID NO 1,

b) Cultivo de la cepa de Escherichia coli transformada obtenida en a) en un medio de cultivo que comprende residuos o desechos industriales como fuente de carbono, para la expresión de la enzima con actividad triacilglicerol sintasa de *Thermomonospora curvata*, codificada por el polinucleótido de SEQ ID NO 1, y

c) Recuperación de los TAGs acumulados en Escherichia coli o en el medio de cultivo.

Para la producción en E coli del enzima tDGAT, se introduce la secuencia del gen tDGAT (SEQ ID NO 1), en el vector de clonado pET29c, vector que añade una cola de LEHHHHHH al enzima producido.

De forma preferida, en el paso b) se emplea el inductor IPTG. Al inducir con IPTG la producción de tDGAT en E coli se observa sorprendentemente una gran producción de TAGs

a las dos horas de la inducción (Figura 1). Esta producción no se detecta en absoluto cuando se utilizaron otros enzimas WS/DGAT de proteobacterias (Figura 1).

La producción de TAGs se correlaciona perfectamente con la cantidad de tDGAT producida, alcanzando un máximo de producción a las tres horas de la inducción (Figura 2). En ese breve espacio de tiempo la bacteria es capaz de producir hasta 50 mg de TAG por litro de cultivo.

La principal ventaja de la invención es la posibilidad de emplear diversos substratos para la obtención de aceite en E coli en un corto espacio de tiempo. Dentro de los substratos metabolizables por E coli, el método de la presente invención emplea de forma preferida aquellos que se producen de forma abundante y barata o que son desechos industriales perjudiciales para el medio ambiente. Dentro de estos substratos abundantes y baratos se podría utilizar glucosa (que se puede obtener de la sacarosa de la caña de azúcar, del almidón de los cereales e incluso de la celulosa de plantas y arboles), fructosa (frutas y miel) o xilosa (obtenida de la hemicelulosa de plantas y arboles o como residuo de industrias de producción de celulosa), glicerol (subproducto de la producción de biodiesel), lactosa (subproducto de la producción de queso), melaza (subproducto de la producción de azucar), residuos orgánicos, aguas residuales urbanas, purines de vaca, etc.

En otra realización principal de la invención, se contempla el empleo de los triglicéridos obtenidos en el método de la invención, o una fracción de los mismos, como biocombustible o como material de partida para la obtención de biocombustible.

Finalmente, en otro aspecto principal de la invención se contempla el empleo de la célula hospedadora de la invención para la obtención de TAGs.

EJEMPLOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Medios de cultivo, selección y conservación.

Para el cultivo en medio líquido se utilizó LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L,

NaCl 5 g/L) (Pronadisa, España). Para el crecimiento en medio sólido se usaron placas de LA (medio LB (Luria-Bertani) suplementado con agar 1,5 % (p/v) (Pronadisa). Todos los medios se esterilizaron en un autoclave a 120 ºC durante 20 minutos. Tanto los medios de cultivo líquidos como los sólidos, se hicieron selectivos añadiendo sulfato de kanamicina (Sigma Aldrich, EE.UU) a una concentración final 50 µg / ml o cloranfenicol (Sigma Aldrich, EE.UU) a 25 µg / ml.

Para los cultivos variando la fuente de carbono se utilizó un medio mínimo (sales M9, 2mM $MgSO_4$ y 0.1mM $CaCl_2$) con las diferentes fuentes de carbono (glucosa, gluconato, fructosa, xilosa, lactosa y glicerol) a 40 g/l.

Las cepas de E. coli se conservaron centrifugando cultivos en fase estacionaria y resuspendiéndolos en una solución 0,75 % (p/v) peptona y 50 % glicerol. Se guardaron a –20 ºC para su uso frecuente o –80 ºC para su conservación a largo plazo.

Construcción de plásmidos.

Los plásmidos utilizados fueron construidos por digestión y clonación de fragmentos amplificados por PCR en vectores de clonaje. Las reacciones de PCR fueron amplificadas con oligonucleótidos con dianas de restricción en sus extremos, iguales a las utilizadas en el vector para digerirlo. Concretamente en el caso del vector pET29c se insertó un fragmento que contiene la SEQ ID NO 1 obtenido por PCR con los cebadores adecuados para añadir en los extremos los sitios de restricción NdeI y XhoI, respectivamente. Así, tras digerir tanto el fragmento de ADN de SEQ ID NO 1 como el vector pET29c con dichos enzimas de restricción y tratar con la ligasa del fago T4 siguiendo los protocolos convencionales de las técnicas de ADN recombinante, se obtuvo el plásmido deseado. En el caso del vector pBAD33, se realizo la construcción de forma similar utilizando los enzimas de restricción KpnI y HindIII y añadiendo un sitio de unión al ribosoma. La digestión de ADN con enzimas de restricción se llevó a cabo con enzimas suministradas por las empresas Roche y Fermentas. En cada caso, se siguieron las condiciones de restricción (tampón, tiempo y temperatura) y desactivación recomendadas por la casa comercial. Para aumentar la eficiencia de obtención de clones recombinantes, en los procesos de clonación se realizaron las reacciones de ligación

usando vectores previamente desfosforilados. Los grupos fosfatos terminales del vector digeridos fueron eliminados previamente mediante el tratamiento con fosfatasa alcalina. Las condiciones de reacción fueron: 20 µl de la mezcla de restricción, 1 µl de fosfatasa alcalina 1 U/µl (Roche), 2,5 µl de tampón de desfosforilación SAP 10x (Roche) y 1,5 µl de agua milliQ. Se incubó la mezcla 1 h a 37 ºC. Las reacciones de ligación se realizaron con una relación molar de 5:1 (inserto: vector). Se utilizó 1 µl de ligasa del fago T4 5 U/µl (Fermentas) y 2 µl del tampón de ligación 10 X en un volumen de 20 µl. La incubación se realizó durante toda la noche a 16 ºC. Tras la reacción, se inactivó la ligasa 10 minutos a 65 ºC. Las construcciones realizadas fueron transformadas por electroporación en una cepa de E. coli, DH5α. Las secuencias de ADN de todos los fragmentos clonados por PCR se verificaron por secuenciación.

Transformación por electroporación.

Para la producción de células competentes de cepas de E. coli DH5α o C41 (DE3), se usó un procedimiento por el que podían ser transformadas con una frecuencia $\geq 5 \times 10^8$ colonias / µg ADN. La cepa deseada de E. coli, se creció a 37 ºC. Las colonias aisladas se transfirieron a LB y se crecieron en agitación a 37 ºC toda la noche. Las células se diluyeron 1:20 en LB y se incubaron en agitación hasta una D.O. a 600 nm de 0.6. A continuación fueron incubadas en hielo durante 30 minutos y recuperadas por centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos. Finalmente fueron lavadas con agua estéril, recuperadas con glicerol al 10 % y congeladas en alícuotas a -80 º C.

El ADN usado para electroporar tiene que estar libre de sales. Por ello, las mezclas de ligación se microdializaron antes de ser mezcladas con las células competentes. Se depositaron sobre un filtro de nitrocelulosa Millipore GS de 0,05 µm de tamaño de poro, en una placa Petri con agua milliQ estéril y tras 30 minutos, se recogió la gota del filtro. Para la transformación se añadieron 5 µl de la mezcla de ligación dializada a 50 µl de células competentes descongeladas en hielo. En el caso de ADN plasmídico purificado, la cantidad usada fue de 1 a 50 pg. Esta mezcla se depositó en una cubeta de electroporación de 0,2 cm Gene Pulser (BioRad), enfriada a 0 ºC. Se sometió a un pulso eléctrico usando un electroporador MicroPulserTM (BioRad) en las siguientes condiciones: 2,5 kV, 25 µF y 200

ohmios. Inmediatamente después, se añadieron 0,9 ml de LB estéril. Se incubaron las células en agitación a 37 ºC, durante el tiempo necesario para la expresión del gen de resistencia al antibiótico empleado, y se plaquearon en medio selectivo.

Extracción de ADN.

Para la extracción y purificación de ADN fueron utilizados diversos kits comerciales. Para aislamiento de plásmidos fue utilizado el kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN). Para la obtención de fragmentos de ADN a partir de bandas extraídas de geles de agarosa se empleó el kit GenElute Gel Extraction (Sigma-Aldrich). Con el fin de purificar las muestras utilizadas para la clonación molecular y para la purificación de ADN de doble cadena de productos de PCR se empleó el kit GenElute PCR Clean-Up (Sigma-Aldrich). La concentración de las muestras de ADN se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm con un espectrofotómetro Nano-Drop ND-1000.

Amplificación general de ADN mediante PCR.

Para amplificar fragmentos de ADN para la construcción de clones se utilizó la polimerasa de alta fidelidad Vent ADN polymerase (BioLabs). La mezcla de reacción fue la siguiente: 5 µl de tampón para PCR ThermoPol 10X (BioLabs), que incluye Mg_2SO_4 a 20 mM, 5 µl de mezcla de nucleótidos a10 mM total (2,5 mM de cada nucleótido), 0.5 µl de cada oligonucleótido cebador a 100 µM, 0,5 µl de polimerasa Vent a 2 U/µl, 10 ng de ADN molde y agua milliQ hasta un volumen final de 50 µl.

Las PCRs empleadas para la comprobación de clones se hicieron con la polimerasa BIOTAQ (Bioline). La mezcla de reacción con esta polimerasa fue: 2,5 µl de tampón para PCR 10X NH_4 (Bioline), 2 µl de mezcla de nucleótidos 10 mM total, 2,5 µl de cada oligonucleótido cebador a 10 µM, 0,2 µl de polimerasa 5 U/µl, 1 µl de $MgCl_2$ a 50 mM, la colonia bacteriana a analizar y agua milliQ hasta un volumen final de 25 µl.

Las PCRs se realizaron en un termociclador UNO II (Biometra). El programa utilizado consistió en un ciclo inicial de desnaturalización de 5 minutos a 94 ºC, para posteriormente

realizar 30 ciclos de: 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a la temperatura de hibridación ADN/cebador y el tiempo de elongación (1 minuto por Kb de ADN amplificado) a 72 °C. Finalmente se realizó un ciclo de 10 minutos a 72 °C para completar la amplificación del fragmento, tras el cual se disminuyó la temperatura de la reacción a 4 °C.

ADNs sintéticos.

Los ORFs sintéticos fueron diseñados con dominancia de codones adaptada a E. coli para la WS/DGATs de termomonospora curvata y adquiridos a GenArt (actualmente Life Technologies). Los oligonucleótidos fueron suministrados por Sigma-Genosys (Sigma-Aldrich, EE.UU.).

Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

Las diferentes moléculas de ADN utilizadas se analizarón por electroforesis en gel de agarosa. La agarosa se disolvió en 0,5 X de TBE (45 mM Tris-HCl pH 8,2, 45 mM ácido bórico, 0,5 mM EDTA) a una concentración de 0,7-1 % p/v, según fuese necesario de acuerdo con el tamaño de los fragmentos de ADN a resolver. Se utilizó SYBR Safe (Invitrogene) para la tinción de ADN a una concentración final de 0,05 mg / ml. El tampón de carga o SAB (0,25 % azul de bromofenol (p/v), glicerol al 30% (p/v) en 0,5 x TBE) se añadió a las muestras de ADN, en una relación 5:1 (ADN / SAB) al volumen de la muestra. El HyperLadder I (Biolabs) se utilizó como marcador de peso molecular. Se usó un sistema horizontal de electroforesis BioRad (80-120 voltios) para correr las muestras. Los geles de agarosa se visualizaron con un sistema Gel Doc 2000 UV y las imágenes fueron analizadas con el software Quantity One (BioRad).

Producción y extracción de la fracción de TAGs de una muestra celular.

Cultivos de 1 l de células C41 (DE3) o DH5□ con el plásmido de interés se crecieron hasta una D.O. a 600 nm de 0.6 y se indujeron con IPTG (0.1 o 1 mM final de IPTG) o Arabinosa (0.05 mM final de arabinosa), respectivamente. Las células se recogieron después de la inducción a diferentes tiempos por centrifugación a 4000 rpm durante 12 minutos a 4 °C. La extracción de la fracción lipídica se realizó sometiendo al pellet que componen las células recogidas de un cultivo a 5 ml de una disolución que contiene una mezcla 3:2, de hexano / 2-

isopropanol en agitación durante 3 horas. Al centrifugar la mezcla a 4000 rpm durante 10 minutos se observa un pellet procedente de los agregados celulares y partículas no solubles y dos fases liquidas bien diferenciadas. La fase orgánica superior que contenía los TAGs fue retirada y concentrada en un evaporador (Christ RVC2-18) a 60 °C. El hexano se evaporó quedando una película nuevamente resuspendida en un volumen menor de hexano.

Cromatografía en capa fina (TLC).

El análisis cualitativo de los TAGs extraídos se realizó por cromatografía en capa fina o TLC. Esta es una técnica analítica semicuantitativa por la que se consiguen separar las distintas especies moleculares de una muestra compuesta por, en este caso, una mezcla de diversos TAGs gracias a su distinta velocidad de migración. El ascenso por capilaridad de una fase móvil por una lámina de nitrocelulosa separa los distintos componentes de la muestra por su mayor o menor hidrofobicidad. Con esta técnica se detectan e identifican rápidamente la existencia o ausencia de las distintas especies moleculares de TAGs de la muestra además de comparar e incluso llegar a cuantificar por densitometría las cantidades obtenidas. En este caso la fase móvil estaba compuesta por 200 ml de hexano, 50 ml de ácido dietiléter y 2.5 ml de ácido acético. Las muestras se cargaron en forma de pequeñas gotas en un mismo punto de una lámina de Polygram Sílica Gel (Macherey-Nagel, Alemania) (matriz inmóvil). Cuando el frente ascendió hasta la parte superior de la lámina esta se retiró, se dejó secar y se reveló con vapor de yodo. Esto hace que los TAGs separados en la matriz se tiñan de un color ocre. Para ayudar a la caracterización de cada una de las manchas se corrieron en uno de los lados una muestra (1 µl) de patrones lipídicos conocidos (Sigma Aldrich) para saber a qué distancia migraban.

Obtención de FAMEs.

Para el estudio de la naturaleza y composición de los ácidos grasos que hay en la fracción lipídica que acumula E. coli transformada con tDGAT hubo que convertirlos en ésteres metílicos o FAMEs. Para la transformación de los ácidos grasos en ésteres metílicos se sometió al pellet celular a 1 ml de reactivo de saponificación (45 g NaOH en 150 ml de metanol y 150 ml dH2O), se agitó durante 30 segundos y se calentó hasta 100 ºC en un baño

durante 5 min. Se retiró la muestra y agitó durante 30 segundos y se devolvió de nuevo la muestra al baño a 100 ºC durante 25 minutos. El tubo se dejó enfriar a temperatura ambiente y se le añadieron 2 ml de reactivo de metilación (325 ml 6 N HCl con 275 ml de metanol). Se agitó durante 30 segundos y se trasladó la muestra a un baño a 80 ºC durante 10 minutos. Se enfrió la muestra en hielo durante cinco minutos y se añadió 1.25 ml de reactivo de extracción (200 ml hexano con 200 ml de metil-t-butil éter), cerrando el tubo y dejándolo en agitación durante 10 min. Se formaron dos fases, descartando la inferior. Se añadieron 3 ml de reactivo de lavado (10.8 g NaOH en 900 ml dH2O), se dejó en agitación suave durante 5 minutos y se descartó la fase superior.

Cromatografía de gases.

Una vez convertidos en FAMEs los ácidos grasos se analizaron por cromatografía de gases en un equipo GC 2100 de Shimadzu con detector FID e inyector automático AOC 20i. Se utilizó una columna HP Innowax 30 m x 0.32 mm, 0.5 □m. La calibración se realizó con el patrón FAME Mix RM-1 (Supelco).

Purificación de tDGAT.

Cultivos de 1 L de células C41(DE3) con el plásmido pET29c::tDGAT se crecieron hasta una D.O. a 600 nm de 0.6 y se indujeron con IPTG (1 mM final de IPTG). Las células se recogieron generalmente tres horas después de la inducción por centrifugación a 4000 r.p.m durante 12 minutos a 4 ºC. El pellet fue recogido y resuspendido en un buffer de lisis (NaCl 1 M, TrisHCl 50 mM pH 7.5 y 100 µl de PMSF) y fue sonicado para conseguir el lisado de las células. Este lisado se ultracentrifugó a 40000 r.p.m durante 15 minutos a 4 ºC y el sobrenadante se cargó en una columna Níquel HisTrap HP GE Healthcare (5 ml) previamente equilibrada con un buffer A (NaCl 1 M, TrisHCl 50 mM pH 7.5). La proteína se eluyó con buffer B (igual que el buffer A pero contenía también 0.5 M de imidazol), concretamente a 0.3 M de imidazol. Aunque la proteína tras su elución por la columna HiTrap generalmente estaba bastante pura, se procedió a concentrarla y a pasarla por una columna Superdex 75 GL10_30 (Pharmacia) previamente equilibrada en buffer NaCl 150 mM TrisHCl 50 mM pH 7.5 1 mM EDTA. Las fracciones ya totalmente puras se almacenaron a -80 ºC al 10% en

glicerol.

La electroforesis de proteínas se llevó a cabo en geles de poliacrilamida/SDS al 10% de poliacrilamida. El tampón de carga (50 mM Tris-HCl pH 6,8, SDS al 4 %, glicerol al 4 % y 0,02 % de azul de bromofenol) se añadió a las muestras en una relación 5:1. Las muestras se calentaron a 100 ºC durante 5 minutos, antes de ser cargadas en el gel de poliacrilamida. Como estándar de control de pesos moleculares, se utilizó el patrón "Low Range" (BioRad Laboratories). La electroforesis se llevó a cabo en un tampón 25 mM Tris-HCl pH 8,3, 200 mM glicina y 1 % SDS. Más tarde, los geles fueron teñidos con una solución que contenía 0,1 % Coomassie Brilliant Blue R-250 (Merck), 50 % de metanol y 10 % de ácido acético glacial a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Preparaciones para el microscopio de fluorescencia.

Se prepararon las distintas células oleogénicas en las diferentes condiciones de cultivo y crecimiento mediante la incubación de las muestras durante 30 min a 4 °C en PBS que contenía 0,5 µg/ml de Rojo Nilo (solución de reserva 0,5 mg / ml en DMSO). Las células se sedimentaron por centrifugación a 16000 g a 4 ºC, y se resuspendieron en metanol durante dos minutos a -20 °C. Después las células se sedimentaron de nuevo por centrifugación, se resuspendieron en PBS y se montaron en portamuestras con Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.). Las muestras fueron examinadas con un microscopio LSM 510 de barrido láser (Zeiss, Alemania) con un objetivo de inmersión en aceite de 63 X (1.4 NA).

EJEMPLO 1.

Producción de TAGs en E. coli.

Para valorar la producción de TAGs en E coli por la expresión del polinucleótido de la invención (SEQ ID 1), se comparó la producción con la de otras construcciones que contenían genes similares (de la familia WS/DGAT). Así, se transformó la cepa C41(DE3) de E. coli, con diferentes construcciones pET29c:WS/DGAT clonadas (Materiales y Métodos). Concretamente se estudiaron tres WS/DGATs de dos gammaproteobacterias (A1TX06 y A1U572 de M. aquaolei y Q0VKV8 de A. borkumensis) por cercanía evolutiva de estas

bacterias con la gammaproteobacteria E. coli. Esta proximidad en principio debiera favorecer la expresión heteróloga de estas enzimas. Sin embargo, las proteobacterias marinas no se caracterizan por acumular grandes cantidades de TAGs sino de ceras, siendo los TAGs moléculas mucho más interesantes desde el punto de vista biotecnológico por su mayor facilidad de acumulación y purificación. Para favorecer la producción de estos TAGs se clonó la secuencia SEQ ID NO 1 que codifica para la WS/DGAT de Thermomonospora curvata YP_003301387 (tDGAT). Analizando la homología de las WS/DGAT con las proteínas codificadas por este microrganismo T. curvata, se observó la aparición de un homólogo putativo cuya secuencia es la SEQ ID NO 2. Para facilitar el clonado y la expresión de dicha enzima se adquirió el ORF con los codones optimizados para E. coli (SEQ ID NO 1).

En cada caso la cepa transformada se creció en LB en presencia de IPTG a 0,1 mM durante toda la noche. Fueron extraídos los TAGs de cada fracción celular resultante y se analizaron por TLC, utilizando como control negativo la célula transformada con el vector de expresión pET29c. En la **Figura 1** se observa que, de todos los cultivos transformados, destaca la acumulación de TAGs producida en el tratamiento con la WS/DGAT procedente de T curvata (calle 6). Así, la sobreexpresión de esta enzima y su actividad convierte a E. Coli C41 (DE3) en un organismo capaz de producir y acumular TAGs. Esta producción era claramente mucho mayor que en células C41 (DE3) que expresan otras WS/DGATs (calles 3 a 5).

EJEMPLO 2

Acumulación de lípidos intracitoplasmáticos en E. coli por tDGAT con el tiempo.

Para la optimización del proceso de producción de TAGs en E. coli transformada con pET29c:tDGAT, se creció un preinóculo de esta bacteria con la construcción en presencia de antibiótico. Cuando el preinóculo estaba en saturación se resembró a un medio fresco hasta alcanzar una densidad óptica, a 600 nm, de 0.6. En ese momento se indujo con IPTG la expresión del gen que codificaba para la proteína tDGAT y se recogió el pellet para la extracción de la fracción lipídica a diferentes tiempos (3, 6 y 24 horas), para determinar en qué momento la producción de TAGs era óptima. Para ello se realizó un TLC con los

extractos orgánicos de los diferentes cultivos (**Figura 2**). Además, se pudo observar que el crecimiento del cultivo estaba ralentizado en todos los tratamientos respecto a C41 (DE3) sin inducir. Probablemente esto fue debido a que una parte importante de la energía de la célula se invertía en la sobreproducción de enzima y TAGs.

Se observó que la producción de TAGs fue rápida, detectándose cambios en el patrón de migración de los TAGs en estadios iniciales del cultivo. Se vió que a las 3 horas de inducción con IPTG 1 mM se conseguía un acúmulo considerable de TAGs. En sólo tres horas tras la inducción de la expresión del gen tDGAT en la fase exponencial del cultivo, se extrajeron hasta 50 mg de TAGseutros por litro de cultivo, siendo estos lípidos mayoritariamente TAGs (**Figura 2B, calle 4**). Por otro lado parece existir un límite en esta producción ya que, ni aumentando el inductor ni el tiempo se detectaban mayores cantidades. A una concentración de IPTG de 1 mM no aumenta la concentración de TAGs entre 3 y 24 horas (**Figura 2B, calle 4 a 6**). Además se observó que con niveles bajos de enzima se conseguía la producción de TAGs ya que en ausencia de inductor, y solo con la producción basal mínima, aparece cierto acúmulo de TAGs (dato no mostrado).

EJEMPLO 3.

Expresión de la WS/DGAT de T. curvata en E. coli y purificación del enzima.

Para comprobar que el acumulo de TAGs observado en la **Figura 2B** se debía a la expresión del gen tDGAT se tomaron muestras de dichas células y se lisaron con el tampón SAB y 5 minutos a 95ºC. Los lisados totales se analizaron por electroforesis SDS/PAGE en un gel del 10%. En la **Figura 2A** se observa que a medida que aumenta el tiempo de expresión aumenta la concentración de la banda señalada. Además, se realizó la purificación de la proteína tDGAT. Para ello se empleó el protocolo de purificación que seexpone en el apartado de Materiales y Métodos. La proteína quedó retenida en la resina de la columna de Ni agarosa gracias a la modificación (His Tag) introducida por el vector de clonaje. Tras la cromatografía de afinidad se realizó una cromatografía de filtración en gel con la columna Superdex 75 (GE), observándose en el cromatograma un único pico de elución. Analizando por

electroforesis SDS PAGE al 10% las fracciones de este único pico se observó que, a pesar de que la proteína resultó ser altamente insoluble y que a lo largo del proceso de purificación se perdía una gran cantidad, se pudo obtener la proteína tDGAT relativamente pura (dato no mostrado).

Según el patrón de pesos moleculares de filtración en gel, el volumen de elución de la proteína purificada corresponde a una proteína de unos 53 KDa que coindice con el tamaño de la proteína tDGAT en estado monomérico.

EJEMPLO 4.

Microscopía de fluorescencia de E. coli transformada con tDGAT.

Para localizar y caracterizar in vivo, el efecto de la acumulación de TAGs en la célula C41 (DE3) transformada con el plásmido pET29c:tDGAT, se realizaron una serie de preparaciones para microscopía de fluorescencia. De esta forma se quería llegar a identificar la estructura o estructuras responsables de este almacenamiento. Se utilizó para ello el método de tinción con Rojo Nilo como fluoróforo y un microscopio de fluorescencia de barrido láser LSM 510 con filtros rojo (543 nm) y verde (488 nm). Se hicieron fotos simultáneas con los dos filtros en los dos tipos de tratamientos, células transformadas con el vector de expresión pET29c y con la construcción pET29c:tDGAT.

En las preparaciones para ambos tratamientos, las fotos hechas en presencia del filtro rojo fueron similares en los dos tipos de cultivos. Sin embargo, se observaron grandes diferencias en las imágenes efectuadas con filtro verde. Con el filtro rojo se destacaban únicamente el contorno y los polos celulares, mientras que con el filtro verde en presencia de la proteína sobreexpresada (**Figura 3**) aparecían nuevas estructuras y mayor intensidad de señal. Las nuevas estructuras se distinguían como pequeños y dispersos puntos de luz en el citoplasma de las células transformadas con la tDGAT (punta de flecha blanca). Estas estructuras no aparecieron en las células transformadas con el vector pET29c. Estos puntos de luz corresponderían a la posible localización in vivo de los TAGs observados en el TLC. En esa

región concreta del citoplasma se depositarían grandes concentraciones de TAGs formando inclusiones citoplasmáticas.

EJEMPLO 5.

Análisis de las FAMEs producidas en E coli transformada con pET29c:tDGAT.

Los experimentos anteriores indicaban que gracias a la acción de la proteína tDGAT en E. coli se producía síntesis de TAGs en cantidad sensiblemente mayor a la bacteria salvaje. Se consideró necesario caracterizar a nivel molecular esta producción analizando qué tipo de ácidos grasos contenía la muestra transformada. Con este fin, se transformó a FAMEs la fracción lipídica de la bacteria transformada con el vector de expresión o con el plásmido pET29c:tDGAT. Ambas extracciones fueron saponificadas con hidróxido sódico y calor y después esterificadas en medio ácido y metanol para conseguir la transformación final de sus ácidos grasos en FAMEs. Estos FAMEs se resuspendieron en diclorometano como solvente y fueron analizados como se detalla en Materiales y Métodos.

En la **Figura 4** están reflejados los resultados de estos análisis. La cuantificación se realizó por cromatografía de gases valorando las áreas de los picos obtenidos mediante patrones moleculares de concentraciones conocidas. En el panel (A) se puede observar el cromatograma resultante de la esterificación a FAMES de los lípidos extraídos en la cepa C41 (DE3) de E. coli transformada con el vector de expresión pET29c. Estos datos servían para conocer la composición de los lípidos totales de la bacteria salvaje que no acumula TAGs. Así, se obtuvieron en cantidad y calidad, los mismos ácidos grasos típicos de una E. coli común como C14:0, C16:0, C18:0, C18:1 y C18:2 (ver tabla 1).

En el segundo caso, se estudiaron los ácidos grasos totales de C41 (DE3) transformada con el plásmido pET29c:tDGAT, **Figura 4 panel (B)**. Así se observó un aumento en tamaño de algunos de los picos resultantes. Esto indicaría una mayor cantidad relativa de FAMEs correspondientes a cada uno de los picos con respecto al control. Este efecto sería atribuido a la acción directa de la proteína en el metabolismo celular. Se retirarían algunos ácidos grasos

necesarios para la biogénesis de otras estructuras y se emplearían en la síntesis de moléculas reservorio de naturaleza lipídica, mayoritariamente TAGs. Concretamente se observó un ligero aumento de los ácidos grasos C14:0, C16:0, C18:0 y C18:1. Se repitieron estos análisis de ambos tratamientos por triplicado obteniéndose en todos ellos resultados similares. Se observó en todos los casos un aumento de la cantidad total de ácidos grasos, sobre todo en el caso del ácido palmítico C16:0 (ver tabla 1).

Tabla 1. *Cuantificación de las concentraciones de los FAMEs obtenidos de la extracción de lípidos neutros del cultivo de E. Coli cepa C41(DE3) transformada con (A) pET29c o (B) pET29c:tDGAT.*

FAME (mg/L)	A	B
C14:0	19,7	68,4
C15:0	-	31,6
C16:0	114,7	381,6
C17:0	-	4,2
C18:0	< ld	18,6
C18:1c	26,5	65,1
C18:3	< ld	34,3

EJEMPLO 6.

Producción de TAGs en E. coli transformada con tDGAT a partir de distintas fuentes de carbono.

Para comprobar hasta qué punto era posible sintetizar TAGs a partir de distintos desechos industriales, se estudió la acumulación de TAGs en E. coli C41 (DE3) transformada con pET29c:tDGAT, utilizando distintas fuentes de carbono presentes en estos desechos. E. coli es un organismo que puede aprovechar de manera natural gran cantidad de glúcidos y varios tipos de alcoholes. Para corroborarlo se creció esta cepa en un Medio Mínimo M9 (Materiales y Métodos) modificando únicamente la fuente de carbono. Se analizaron por TLC los TAGs extraídos de cada uno de los cultivos partiendo, en todos los casos, de la misma cantidad de biomasa húmeda. Se indujo la acumulación de TAGs en cultivos con seis fuentes de carbono

diferentes. Estas se eligieron debido a un posible interés industrial, o a los distintos problemas que causan cuando aparecen en forma de contaminantes. Las fuentes de carbono elegidas fueron Glucosa, Gluconato, Fructosa, Xilosa, Lactosa y Glicerol:

Glucosa. Azúcar hexosa de la lignocelulosa, el almidón, el azúcar de caña, etc. Azúcar mas abundante de la naturaleza cuya obtención a partir de la lignocelulosa (principal componente de la biomasa) está muy desarrollada actualmente.

Gluconato. : Fuente de carbono principal de otros microorganismos oleogénicos como rhodococcus.

Fructosa. Es el residuo principal de multitud de industrias alimentarias que procesan por ejemplo melazas de origen vegetal.

Xilosa. azúcar pentosa de la lignocelulosa. No tan abundante como la glucosa, pero muy abundante en el residuo de hemicelulosa producido en las industrias papeleras o productoras de celulosa textil.

Lactosa. Disacárido formado por glucosa y galactosa desechado en industrias alimentarias que trabajan habitualmente con derivados lácteos. La concentración de azúcar lactosa en el suero de leche es de unos 50 g/l.

Glicerol. Desecho mayoritario producido en la esterificación química del biodiesel. Se produce glicerol como subproducto principal que no es aprovechado directamente en el proceso.

En la **Figura 5** se puede observar que la producción de TAGs es prácticamente independiente de la fuente de carbono utilizada. Con xilosa, lactosa y, sobre todo, glicerol el microorganismo crecía más lentamente que con glucosa, gluconato, y fructosa. De todas las fuentes utilizadas cabe destacar que se consiguió producir TAGs a partir de lactosa pura. Esto sugiere que la cepa C41 (DE3) transformada con tDGAT podría emplearse de manera eficaz

para aprovechar el suero lácteo de origen industrial.

EJEMPLO 7.

Producción de TAGs en E. coli usando un vector inducible por arabinosa

Para expresar tDGAT en las células DH5□se clonó el gen en el plásmido pBAD33 cuyo promotor es reconocido por la RNA polimerasa de E. coli y está reprimido en ausencia de arabinosa.

Se realizó el clonaje de la construcción pBAD33:tDGAT como se describe en Materiales y Métodos y se transformaron las cepas de E. coli DH5α. Se crecieron las células de la misma manera que en el caso de C41 pET:tDGAT, cambiando únicamente de inductor (arabinosa en lugar de IPTG) y el antibiótico (cloramfenicol en vez de kanamicina). En el TLC de la **figura 6** se observa que la construcción pBAD33:tDGAT es funcional y convierta a la bacteria DH5α en una bacteria en productora de TAGs. La producción de TAGs por esta cepa era visible pero fue sensiblemente menor en todos los tratamientos con respecto al caso de las C41 (DE3), aunque los niveles de proteína producidos por el plásmido pBAD33:tDGAT eran similares a los producidos por el sistema pET. Esto podría ser debido a que las células C41 (DE3) poseen una mayor superficie de membrana. Si las inclusiones lipídicas comienzan a formarse en la membrana, como proponen algunos modelos, este factor podría estar favoreciendo la acumulación de TAGs

REIVINDICACIONES

1. Polinucleótido aislado que presenta al menos un 75 % de homología con la secuencia SEQ ID NO 1.

2. Polinucleótido aislado, según la reivindicación 1, procedente de Thermomonospora curvata, que codifica para una enzima con actividad triacilglicerol sintasa.

3. Polipéptido aislado, que presenta al menos un 75 % de homología con la secuencia SEQ ID NO 2, con actividad triacilglicerol sintasa, codificado por el polinucleótido de la reivindicación 1 ó 2.

4. Vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 1 ó 2.

5. Vector, según la reivindicación 4, donde dicho vector se selecciona de entre pET29c y pBAD33.

6. Célula hospedadora transformada con el vector de la reivindicación 4.

7. Célula hospedadora, según la reivindicación 6, donde dicha célula es una bacteria.

8. Célula, según la reivindicación 7, donde la bacteria es Escherichia coli.

9. Cepa de Escherichia coli transformada con el vector pET29 que comprende el polinucleótido de secuencia SEQ ID NO 1.

10. Método para la obtención de TAGs que comprende los siguientes pasos:
    a. Obtención de la célula hospedadora transformada de la reivindicación 6,
    b. Cultivo de la célula hospedadora transformada obtenida en a) en un medio de cultivo que comprende residuos o desechos industriales como fuente de

carbono, y

c. Recuperación de los TAGs acumulados en la célula hospedadora o en el medio de cultivo de b).

11. Método, según la reivindicación 10 , para la obtención de TAGs que comprende los siguientes pasos:

a. Obtención de una cepa de Escherichia coli transformada con el vector pET29c que comprende el polinucleótido aislado de secuencia SEQ ID NO 1,

b. Cultivo de la cepa de Escherichia coli transformada obtenida en a), en un medio de cultivo que comprende residuos o desechos industriales como fuente de carbono, y

c. Recuperación de los TAGs acumulados en Escherichia coli o en el medio de cultivo.

12. Método, según la reivindicación 11, donde se emplea IPTG como agente inductor en el paso b).

13. Empleo de los TAGs obtenidos en el método de la reivindicación 10, o una fracción de los mismos, como biocombustible o como material de partida para la obtención de biocombustible.

14. Empleo de una célula hospedadora, según cualquiera de las reivindicaciones 6-9 para la obtención de TAGs.

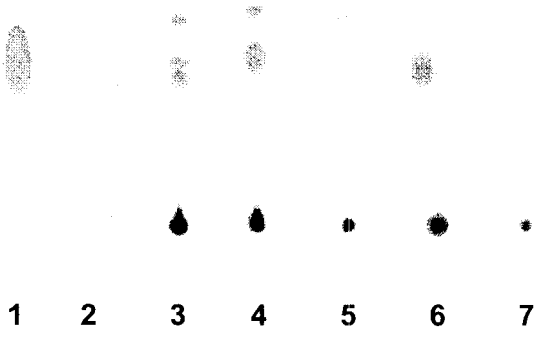

FIGURA 1

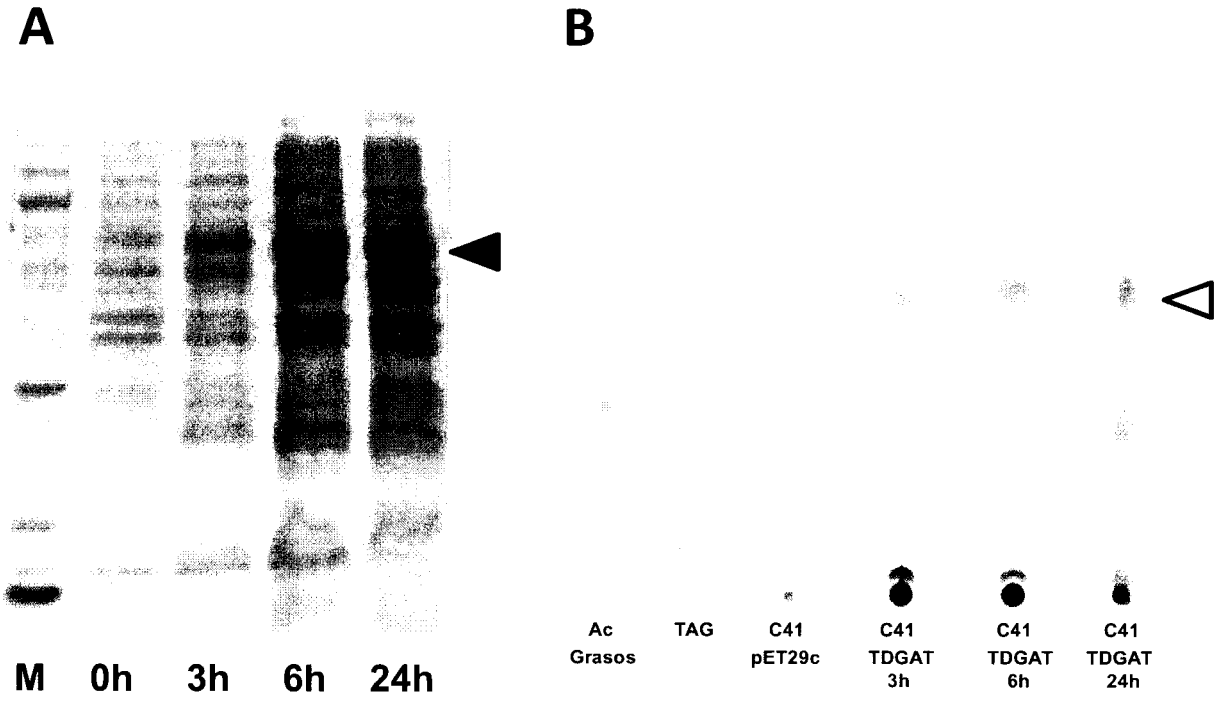

FIGURA 2

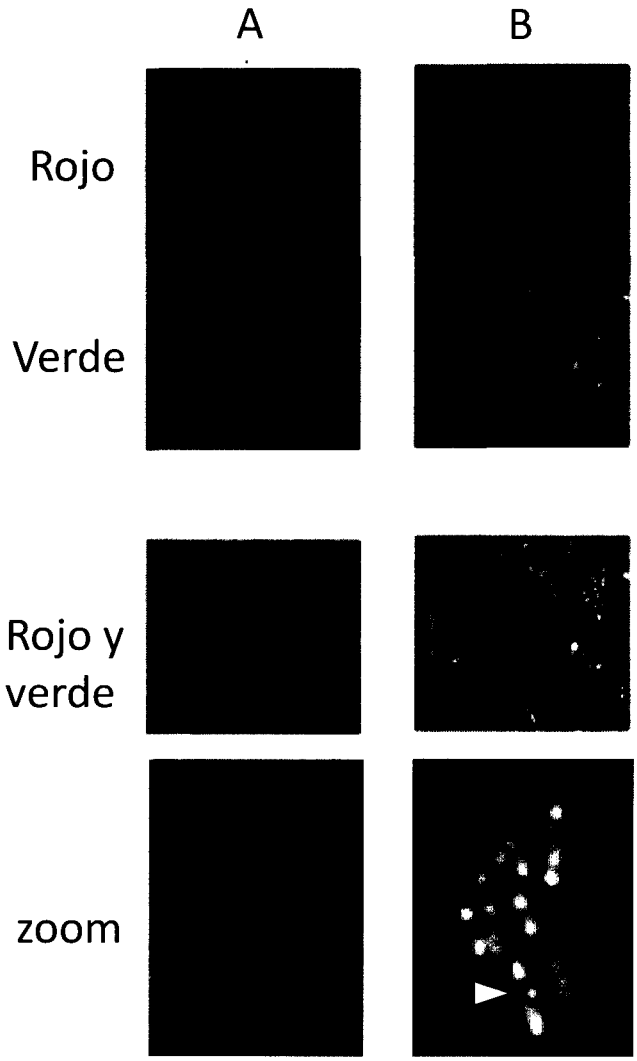

FIGURA 3

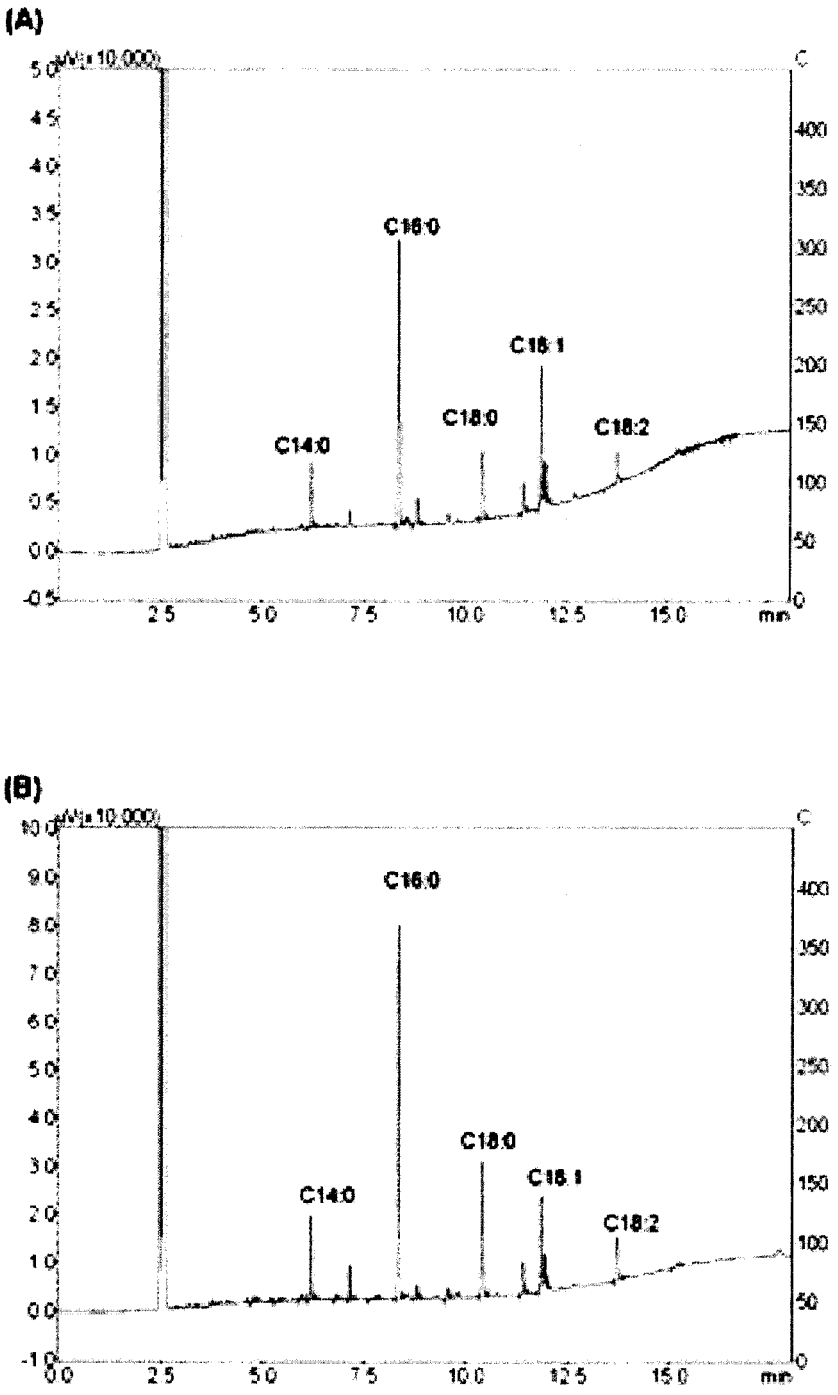

FIGURA 4

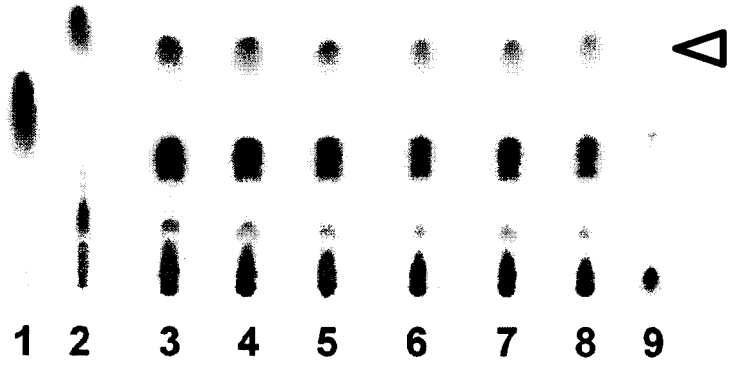

FIGURA 5

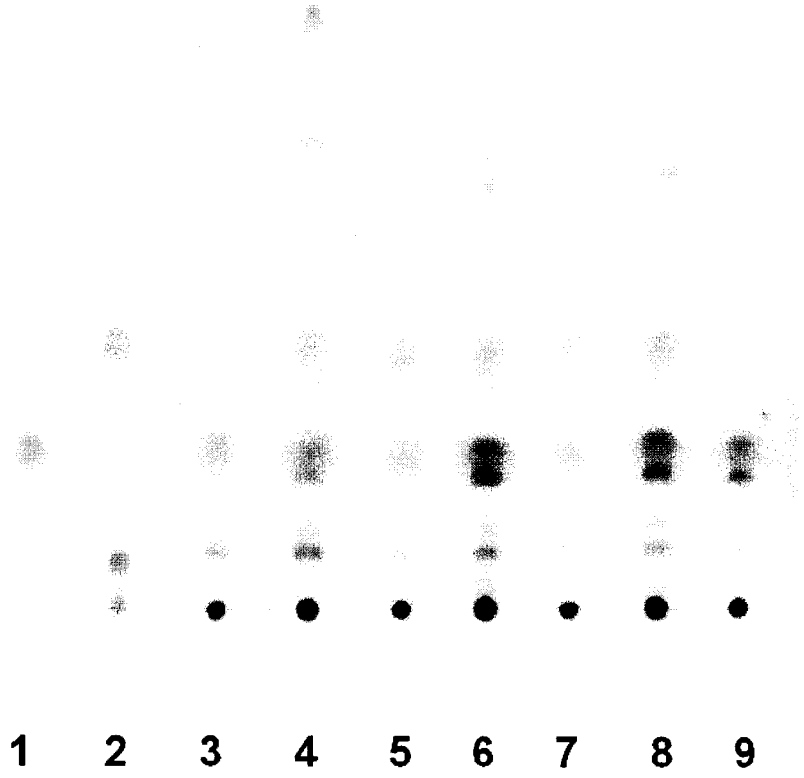

FIGURA 6

Listado de Secuencias

<110> UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

<120> Triacilglicerol sintasas termoestables y usos de las mismas

<130> 108/12

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 1446
<212> DNA
<213> Thermomonospora curvata

<220> Secuencia de ADN que codifica para la proteína tDGAT con los codones optimizados para su expresión en Escherichia coli.
<223>

<400> 1
atgcgtcagt taacagcagt tgatgcaaat tttctgaatg ttgaaaccgg caccacccat 60

gcacatattg caggtctggg tattctggat ccggttgcat gtccgggtgg tcgtctgacc 120

gcagaagatc tgattgaagt tattcgtgaa cgtgcacatc tggcaccgcg tccgctgcgc 180

atgcgtctgg ctgcagttcc gctgggtatt gatcgtccgt attgggaaga tgatccggat 240

tttgatccgg cacgtcatgt ttttgaagtt ggtctgcctg caccgggtaa tgcagctcag 300

ctggcagatg ttgttgcaat gctgcatgaa cgtcctctgg atcgtgcacg tccgctgtgg 360

gaagcagttg ttattcaggg tctggaaggt ggtcgtaccg cagtttatat taaagttcat 420

catgcagccg ttgatggtgt tctggcaacc gaaaccctgg cagcactgct ggatctgagt 480

ccgcagcctc gtgaactgcc tccggacgat accgttccgc agcaggcacc ggcactggca 540

gaacgtgttc gtaccggtct gctgcgtgca ctggcacatc cggttcgtgg tgcacgtatg 600

ctggcacgta ccgcaccgta tctggatgaa attccgggtc tggcacagct gcctggtgtt 660

cagcctctgg cacgcgcaat tcagggtgca ctgggtcgtg atggtgttgt tccgctgcct 720

cgtaccgttg cacctccgac cccgtttaat ggcaccatta gcgcacgtcg tgcagttgca 780

tttggcgaac tgccgctggc agaaattcgt cgtattcgtc gcgaactggg tggtagcgtt 840

aatgatgttg ttatggcact ggttgcaacc gcactgcatc gttggctgga taaacgtggt 900

gaactgccgg atcgtccgct ggttgcagcc gttccggtta gcctgcgtcg tggccgtgat 960

ggtgatgcag ccggtggtaa tcgtatgagc gcaatggtta cacctctggc aacccatctg 1020

gcagatccgg cagaacgttt tgcagcaatt cgtggtgatc tggcagcagc aaaacgtcgc 1080

tttgcacgta gcagcggtgc atggctggaa ggtctgagcg aactggttcc ggcacctctg 1140

gcaggtccgc tgctgcgtct ggcactgcag gcacgtccgg gtgaatatct gcgtccggtt 1200

aatctgctgg ttagcaatgt tccgggtccg gattttccgc tgtatctgcg tggtgcccgt 1260

gttctgggtt attttccgat tagcgttgtt agcgatctga ccggtggtct gaatattacc 1320

gttctgagct atgatggcaa actggatgtt ggtattgtta cctgtcgtca gatgattccg 1380

gatccgtggg aaattatgga tcatctggat gatgcactgg gtgaactgcg tggtctgatt 1440

gatggt 1446

<210> 2
<211> 482
<212> PRT
<213> Thermomonospora curvata

<220> Proteína aciltransferasa WS/DGAT/MGAT (YP_003301387.1) de T. curvata DSM 43183
<223>

<400> 2

Met Arg Gln Leu Thr Ala Val Asp Ala Asn Phe Leu Asn Val Glu Thr
1 5 10 15

Gly Thr Thr His Ala His Ile Ala Gly Leu Gly Ile Leu Asp Pro Val
20 25 30

Ala Cys Pro Gly Gly Arg Leu Thr Ala Glu Asp Leu Ile Glu Val Ile
35 40 45

Arg Glu Arg Ala His Leu Ala Pro Arg Pro Leu Arg Met Arg Leu Ala
50 55 60

Ala Val Pro Leu Gly Ile Asp Arg Pro Tyr Trp Glu Asp Asp Pro Asp
65 70 75 80

Phe Asp Pro Ala Arg His Val Phe Glu Val Gly Leu Pro Ala Pro Gly
85 90 95

Asn Ala Ala Gln Leu Ala Asp Val Val Ala Met Leu His Glu Arg Pro
100 105 110

Leu Asp Arg Ala Arg Pro Leu Trp Glu Ala Val Val Ile Gln Gly Leu
115 120 125

Glu Gly Gly Arg Thr Ala Val Tyr Ile Lys Val His His Ala Ala Val
130 135 140

Asp Gly Val Leu Ala Thr Glu Thr Leu Ala Ala Leu Leu Asp Leu Ser
145 150 155 160

Pro Gln Pro Arg Glu Leu Pro Pro Asp Asp Thr Val Pro Gln Gln Ala
165 170 175

Pro Ala Leu Ala Glu Arg Val Arg Thr Gly Leu Leu Arg Ala Leu Ala
180 185 190

His Pro Val Arg Gly Ala Arg Met Leu Ala Arg Thr Ala Pro Tyr Leu
195 200 205

```
Asp Glu Ile Pro Gly Leu Ala Gln Leu Pro Gly Val Gln Pro Leu Ala
    210                 215                 220

Arg Ala Ile Gln Gly Ala Leu Gly Arg Asp Gly Val Val Pro Leu Pro
225                 230                 235                 240

Arg Thr Val Ala Pro Pro Thr Pro Phe Asn Gly Thr Ile Ser Ala Arg
                245                 250                 255

Arg Ala Val Ala Phe Gly Glu Leu Pro Leu Ala Glu Ile Arg Arg Ile
            260                 265                 270

Arg Arg Glu Leu Gly Gly Ser Val Asn Asp Val Val Met Ala Leu Val
        275                 280                 285

Ala Thr Ala Leu His Arg Trp Leu Asp Lys Arg Gly Glu Leu Pro Asp
    290                 295                 300

Arg Pro Leu Val Ala Ala Val Pro Val Ser Leu Arg Arg Gly Arg Asp
305                 310                 315                 320

Gly Asp Ala Ala Gly Gly Asn Arg Met Ser Ala Met Val Thr Pro Leu
                325                 330                 335

Ala Thr His Leu Ala Asp Pro Ala Glu Arg Phe Ala Ala Ile Arg Gly
            340                 345                 350

Asp Leu Ala Ala Ala Lys Arg Arg Phe Ala Arg Ser Ser Gly Ala Trp
        355                 360                 365

Leu Glu Gly Leu Ser Glu Leu Val Pro Ala Pro Leu Ala Gly Pro Leu
    370                 375                 380

Leu Arg Leu Ala Leu Gln Ala Arg Pro Gly Glu Tyr Leu Arg Pro Val
385                 390                 395                 400

Asn Leu Leu Val Ser Asn Val Pro Gly Pro Asp Phe Pro Leu Tyr Leu
                405                 410                 415

Arg Gly Ala Arg Val Leu Gly Tyr Phe Pro Ile Ser Val Val Ser Asp
            420                 425                 430

Leu Thr Gly Gly Leu Asn Ile Thr Val Leu Ser Tyr Asp Gly Lys Leu
        435                 440                 445

Asp Val Gly Ile Val Thr Cys Arg Gln Met Ile Pro Asp Pro Trp Glu
    450                 455                 460

Ile Met Asp His Leu Asp Asp Ala Leu Gly Glu Leu Arg Gly Leu Ile
465                 470                 475                 480
```

Asp Gly

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201200967

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 28.09.2012

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	Base de Datos ENA ('European Nucleotide Archive') [on line], 23.11.2011 [recuperado el 17.05.2013], "Thermomonospora curvata DSM 43183 acyltransferase, WS/DGAT/MGAT", Recuperado de ENA en EMBL-EBI Services: Código de acceso (ID): ACY99349.1.	1-9
X	Base de Datos UNIPROTKB [on line], 03.10.2010 [recuperado el 17.05.2013], "Acyltransferase, WS/DGAT/MGAT", Recuperado de UNIPRO en EMBL-EBI Services: Código de acceso (AC): D1AD40& CHERTKOV, O. et al. 'Complete genome sequence of Thermomonospora curvata type strain (B9).', STANDARDS IN GENOMIC SCIENCES, 2011 Feb, Vol. 4, No. 1, páginas 13-22, ISSN: 1944-3277, todo el documento.	1-9
A	BAILLY-BECHET, M. et al., 'Codon usage domains over bacterial chromosomes', PLOS COMPUTATIONAL BIOLOGY, 2006, Vol. 2, No. 4, página e37, ISSN: 1553-734X (print), ISSN: 1553-7358 (electronic), todo el documento.	1-9
A	STOLETZKI, N. et al., 'Synonymous codon usage in Escherichia coli: selection for translational accuracy', Molecular Biology and Evolution, 2007, Vol. 24, No. 2, páginas 374-381, ISSN: 0737-4038, todo el documento.	1-9
A	DUAN, Y. et al., 'De novo biosynthesis of biodiesel by Escherichia coli in optimized fed-batch cultivation', PLOS ONE, 2011, Vol. 6, No. 5, página e20265, ISSN: 1932-6203 (electronic), Epub: 23.05.2011, todo el documento.	1-9
A	KALSCHEUER, R. et al., 'Microdiesel: Escherichia coli engineered for fuel production', MICROBIOLOGY, 2006, Vol. 152, No. 9, páginas 2529-2536, ISSN: 1350-0872, todo el documento.	1-9
A	KALSCHEUER, R. et al., 'Synthesis of novel lipids in Saccharomyces cerevisiae by heterologous expression of an unspecific bacterial acyltransferase', APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 2004, Vol. 70, No. 12, páginas 7119-7125, ISSN 0099-2240 (ISSN print), todo el documento.	1-9

Categoría de los documentos citados
X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
20.05.2013	J. L. Vizán Arroyo	1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N9/10 (2006.01)
C12N1/21 (2006.01)
C12P7/64 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C12P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 20.05.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	10-14	**SI**
	Reivindicaciones	1-9	**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	10-14	**SI**
	Reivindicaciones	1-9	**NO**

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Base de Datos ENA ('European Nucleotide Archive') [on line], 23.11.2011 [recuperado el 17.05.2013], "Thermomonospora curvata DSM 43183 acyltransferase, WS/DGAT/MGAT", Recuperado de ENA en EMBL-EBI Services: Código de acceso (ID): ACY99349.1.	23.11.2011
D02	Base de Datos UNIPROTKB [on line], 03.10.2010 [recuperado el 17.05.2013], "Acyltransferase, WS/DGAT/MGAT", Recuperado de UNIPRO en EMBL-EBI Services: Código de acceso (AC): D1AD40 & CHERTKOV, O. et al., *Stand Genomic Sci*., (2011 Feb), 4(1):13-22.	03.10.2010
D03	BAILLY-BECHET, M. et al., *PLoS Comput. Biol.*, (2006), 2(4):e37.	2006
D04	STOLETZKI, N. et al., *Mol. Biol. Evol*., (2007), 24(2): 374-81.	2007
D05	DUAN, Y. et al., *PLoS One*. (2011), 6(5): e20265.	2011
D06	KALSCHEUER, R. et al., *Microbiology*, (2006), 152(Pt 9): 2529-36.	2006
D07	KALSCHEUER, R. et al., *Appl. Environ. Microbiol*., (2004), 70(12): 7119-25.	2004

En D1-D2 se describe tanto una secuencia codificante de nucleótidos como la codificada de aminoácidos de la actividad Aciltransferasa WS/DGAT/MGAT de *Thermomonospora curvata*.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes).

1.1. Reivindicación independiente 1 (en parte).

1.1.1. El objeto de la reivindicación 1 consiste en un polinucleótido aislado que presenta al menos el 75% de homología con la secuencia SEQ ID NO 1. Además, según la reivindicación 2, dicha secuencia procede de *Thermomonospora curvata* y codifica para una enzima con actividad triacilglicerol sintetasa (Aciltransferasa WS/DGAT/MGAT).

1.1.2. En el documento D1 se describe una secuencia de nucleótidos localizada en el genoma de *Thermomonospora curvata* que codifica para una enzima con actividad Aciltransferasa WS/DGAT/MGAT. Según la herramienta FASTA de 'EMBL-EBI Services' para la investigación de identidades entre secuencias, la secuencia descrita en D1 muestra un 75,1% de identidad con la secuencia SEQ ID NO 1 reivindicada. Por consiguiente, se considera que el objeto de protección de la reivindicación independiente 1 y el de las dependientes 2-9 (en parte) no es nuevo sobre la base del documento D1.

1.2. Reivindicación independiente 3.

1.2.1. El objeto de la reivindicación 3 consiste en un polipéptido aislado que presenta al menos el 75% de homología con la secuencia SEQ ID NO 2 con actividad triacilglicerol sintetasa (Aciltransferasa WS/DGAT/MGAT).

1.2.2. 1.2.2. En el documento D2 se describe la secuencia de aminoácidos con actividad Aciltransferasa WS/DGAT/MGAT codificada por el genoma de *Thermomonospora curvata*. Según la herramienta FASTA de 'EMBL-EBI Services', la secuencia descrita en D2 presenta un 100% de identidad con la secuencia SEQ ID NO 2 reivindicada. Por consiguiente, se considera que el objeto de protección de la reivindicación independiente 3 no es nuevo sobre la base del documento D2.

1.3. La presente solicitud no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones (1-2, 4-9) (en parte) y el de la 3 no es nuevo de acuerdo con el Art. 6.1. de la Ley de Patentes.

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

2.1. Reivindicación independiente 1 (en parte).

2.1.1. El documento D1 constituye el estado de la técnica más próximo. En él se describe se describe una secuencia de nucleótidos del genoma de *Thermomonospora curvata* que codifica para una enzima con actividad Aciltransferasa WS/DGAT/MGAT.

2.1.2. El problema técnico a resolver por el objeto de la reivindicación independiente 1 puede ser considerado, por consiguiente, como la provisión de secuencias de polinucleótidos que comprendan nuevas variantes de la secuencia del gen de *Thermomonospora curvata* que codifica para la enzima con actividad Aciltransferasa WS/DGAT/MGAT.

2.1.3. La solución propuesta en la reivindicación 1 consiste básicamente en la secuencia SEQ ID NO 1. Según la descripción, dicha secuencia ha sido optimizada según el uso predominante de codones de *Escherichia coli* para su expresión mejorada en dicha Gammaproteobacteria (cf. Página 6, líneas 28-32). Esta característica técnica constituye la diferencia básica entre la secuencia SEQ ID NO 1 de la solicitud y la descrita en D1. En el estado de la técnica se han descrito los codones de uso más frecuente en *Escherichia coli* y su aplicación en el diseño de sistemas de expresión de genes heterólogos (cf. D3-D4).

Por consiguiente, se considera que ante el problema técnico planteado, el experto en la materia combinaría las enseñanzas divulgadas en D1 con las de D3 y D4 llegando a la solución propuesta en la reivindicación 1 o a una equivalente. Por todo ello, se considera que la reivindicación 1 (en parte) y las reivindicaciones dependiente (2, 4-9) (en parte) no son inventivas.

2.2. La presente solicitud no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 1, 2, 4-9 (en parte) no implica actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1. de la Ley de Patentes.